

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

19/37,DE/36 (Item 36 from file: 351)

J9559124 WPI Acc No: 93-252671/32

XRAM Acc No: C93-112308

Bispecific antibody for cancer treatment - composed of an anti C-erbB  
@B@-2 gene prod. monoclonal antibody and an anti CD3 monoclonal  
antibody

Index Terms: BI SPECIFIC ANTIBODY CANCER TREAT COMPOSE ANTI GENE PRODUCT  
MONOCLONAL ANTIBODY ANTI MONOCLONAL ANTIBODY

Patent Assignee: (KYOW ) KYOWA HAKKO KOGYO KK

Number of Patents: 001

Number of Countries: 001

Patent Family:

Patent No Kind Date Week Applic No Date LA Pages IPC

JP 5170667 A 930709 9332 JP 91344502 911226 7 @A61K-039/395 @ (B)

Priority Data (CC No Date): JP 91344502 (911226)

Abstract (Basic): JP 05170667 A

The antibody is composed of an anti C-erbB @B@-2 gene prod.  
monoclonal antibody and an anti CD3 monoclonal antibody. More  
specifically, the anti C-erbB @B@-2 gene prod. monoclonal antibody is  
SER-4 and the anti CD3 monoclonal antibody is OKT-3.

USE/ADVANTAGE - The bispecific antibody is effective for  
cancer treatment.

Examples are as follows: (1) immunisation of animal and  
prepn. for an antibody producing cells where 6 week old BALB/c mouse  
was immunised with human breast carcinoma cell SK-BR-3 (ATCC HTB 30)  
and after final immunisation, spleen was extirpated and red blood cells  
removed were used for cell fusion; (2) prepn. of mouse myeloma cells

where 8-azaguanine-resistant mouse myeloma cell line P3-X63-Ag8653 was  
used. (3) prepn. of hybridoma where mouse spleen cells obtd. by (1) and  
mouse myeloma cells (2) were mixed in a ratio of 10 : 1 using PEG-1000  
as accelerator, fused in MEM-DMSO mixed soln., hybridoma being selected  
by twice cloning on HAT medium; (4) prepn. of an monoclonal antibody  
where pristine treated 8 week old nude female mouse was used; and (5)  
prepn. of a bispecific antibody where obtd. monoclonal antibody OKT-3  
and monoclonal antibody SER-4 were used, and fragments Fab'-S-NB and  
Fab'-SH prepd. from these monoclonal antibodies were mixed at 1 : 1,  
incubated at room temp. for 4 hrs. and produced reconstructed F(ab')<sub>2</sub>  
was isolated as a bispecific antibody. Dwg.0/4

Derwent Class: @B04@; @D16@;

Int Pat Class: @A61K-039/395@; @C07K-015/28@; @C12N-005/20@; @C12N-015/06@;  
@C12P-021/06@; @C12P-021/08@; @C12P-021/08@ @C12R-001-91@

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-170667

(43) 公開日 平成5年(1993)7月9日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/395	ADU T	8413-4C		
C 0 7 K 15/28		7731-4H		
// C 1 2 N 5/20				
		7236-4B	C 1 2 N 5/00	B
		8931-4B	15/00	C

審査請求 未請求 請求項の数3(全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-344502

(22) 出願日 平成3年(1991)12月26日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年8月10日  
日本癌学会発行の「第50回日本癌学会総会記事」に発表

(71) 出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社  
東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72) 発明者 西村 孝司

神奈川県厚木市飯山2241-8

(72) 発明者 益子 高

宮城県仙台市太白区太白2丁目9-3-202

(72) 発明者 橋本 嘉幸

宮城県仙台市太白区三神峯1-3-3-506

(72) 発明者 垣生 園子

東京都多摩市桜ヶ丘2-28-2

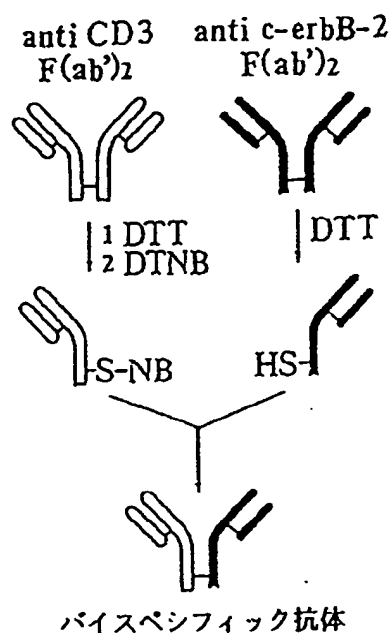
(54) 【発明の名称】 バイスベシフィック抗体

(57) 【要約】

【目的】 癌の治療に有効なバイスベシフィック抗体を提供する。

【構成】 抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体と抗CD3モノクローナル抗体からなるバイスベシフィック抗体。

第1図



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体と抗CD3モノクローナル抗体からなるバイスペシフィック抗体

【請求項2】 抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体がSER-4である請求項1記載のバイスペシフィック抗体

【請求項3】 抗CD3モノクローナル抗体がOKT-3である請求項1記載のバイスペシフィック抗体

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、癌治療に有用なバイスペシフィック抗体を提供する。

## 【0002】

【従来の技術】 受動腫瘍免疫療法の大きな問題点の一つに、エフェクター細胞を腫瘍部位に標的させることの困難さがある。キラー細胞と標的細胞の両方に反応するバイスペシフィック抗体により抗腫瘍エフェクター細胞を特異的に標的細胞に運ぶ試みがなされている〔ネイチャー(Nature), 316, 354-356 (1985)、同, 314, 628-631 (1985)〕。バイスペシフィック抗体とは、2つの異なった抗原特異性を認識する、化学的方法または細胞融合によって作製された合成抗体である。

【0003】 バイスペシフィック抗体を作製する方法としては、2つのイムノグロブリン分子をN-サクシンイミジル-3-(2-ピリジリジチオール)-プロピオネート [N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol)-propionate] やS-アセチルメルカプトサクシニクアシッド アンハイドライド (S-acetylmercaptosuccinic acid anhydride) などの架橋剤を用いて結合して作製する方法〔ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med.), 163, 166-178 (1986)〕、イムノグロブリン分子のFabフラグメントどうしを結合して効率良く作製する方法〔ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Eur. J. Immunol.), 19, 1437-1441 (1989)〕などが報告されている。

【0004】 臨床例と実験事実によって、抗CD3モノクローナル抗体と抗腫瘍モノクローナル抗体からなるバイスペシフィック抗体を用いた受動腫瘍免疫療法が腫瘍療法において有効な手段であることが証明されている〔ランセット(Lancet), 335, 368-372 (1990)、イムノロジー・トゥデー(Immunol. Today), 12, 51-54 (1991)〕。もし、腫瘍細胞に広く分布している好適な標的分子を見だし、それに対するバイスペシフィック抗体を作ることができるなら、受動腫瘍免疫療法との組み合わせで癌治療に適応可能な治療法となるだろう。

【0005】 ヒトc-erbB-2プロトオンコジーン産物の細胞外ドメインを認識するモノクローナル抗体をつくることに成功したことが報告されている〔モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Mol. Cell. Bio.), 9, 1165-1172 (1989)、バイオケミカル・ソサイアティ・トラ

2

ンスアクション(Bio. Soc. Trans.), 16, 675-677 (1988)〕。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、癌の治療に有用なバイスペシフィック抗体を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体と抗CD3モノクローナル抗体からなるバイスペシフィック抗体を提供することができる。c-erbB-2遺伝子とその産物は、種々のヒト腺癌において増幅発現していることが証明されているので、抗CD3モノクローナル抗体と抗c-erbB-2モノクローナル抗体からなるバイスペシフィック抗体ができれば受動腫瘍免疫療法との組み合わせで、臨床上治療効果の高いものになることが予想される。

【0008】 以下に本発明を詳細に説明する。c-erbB-2遺伝子産物に対するモノクローナル抗体の作製は、以下のとおり行う。c-erbB-2遺伝子産物を高発現しているヒト乳癌細胞株などを免疫した動物の脾細胞とマウスの骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマを作製し、c-erbB-2遺伝子産物を発現している細胞と反応し、c-erbB-2遺伝子産物を発現していない細胞と反応しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択する。該ハイブリドーマを培地で培養するか、マウスに投与して該マウスを腹水癌化させ、該培養液、または腹水よりプロテインAカラムなどで精製したものを抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体の精製抗体として準備する。CD3に対するモノクローナル抗体は、ヒト末梢血リンパ球を免疫することにより作製可能であるが、すでに確立されているOKT-3などのハイブリドーマを用いて産生することもできる。

【0009】 このようにして得られる2種のモノクローナル抗体をペプシンやパバインで処理し、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを得る。さらに、これらをそれぞれジチオスレイトール(DTT)などを用いて還元することにより、遊離のSH-基を有するFab'-SHに変換する。次にどちらか一方のFab'-SHを5,5'-ジチオビス-2-ニトロベンゾイックアシッド(DTNB)などで処理することによりFab'フラグメントのニトロベンゼン誘導体であるFab'-S-NBに変換する。得られるFab'-SHとFab'-S-NBとを混合し、Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC)などで精製することにより、バイスペシフィック抗体を作製する。

【0010】 以下に、本発明のバイスペシフィック抗体の製造法を詳細に説明する。

## (1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

c-erbB-2遺伝子産物に対するモノクローナル抗体の作製：3~20週令のマウスまたはラットに抗原(c-erbB-2遺伝子産物を高発現している細胞)を免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取す

3

る。免疫は、動物の皮下、静脈内あるいは腹腔内に適当なアジュバント（例えば、フロインドの完全アジュバント（Complete Freund's Adjuvant）、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど）とともに抗原を投与することにより行う。

【0011】抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに5～10回行う。各投与後3～7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法（酵素免疫測定法（ELISA法）：医学書院刊 1976年）などで調べる。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを脾細胞の供給源として提供する。

【0012】CD3に対するモノクローナル抗体の作製：3～20週令のマウスまたはラットに抗原（ヒト末梢血リンパ球）を免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下、静脈内あるいは腹腔内に適当なアジュバント（例えば、フロインドの完全アジュバント、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど）とともに抗原を投与することにより行う。抗原の投与は、1回目の投与の後1～2週間おきに5～10回行う。各投与後3～7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法などで調べる。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを脾細胞の供給源として提供する。

【0013】脾細胞と骨髄腫細胞の融合に供するにあたって、抗原物質の最終投与後3～7日目に、免疫したマウスまたはラットより脾臓を摘出し、脾細胞を採取する。脾臓をMEM培地中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離（1,200rpm、5分）した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去し、MEM培地で3回洗浄して融合用脾細胞として提供する。

#### 【0014】（2）骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスから得られた株細胞を使用する。たとえば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1（P3-U1）〔ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー（Eur. J. Immunol.）, 6, 511-519（1976）〕、SP2/0-Ag14（SP-2）〔ネイチャー（Nature）, 276, 269-270（1978）〕、P3-X63-Ag8653（653）〔ジャーナル・オブ・イムノロジー（J. Immunol.）, 123, 1548-1550（1979）〕、P3-X63-Ag8（X63）〔ネイチャー（Nature）, 256, 495-497（1975）〕などが用いられる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地（RPMI-1640培地にグルタミン（1.5mM）、2-メルカプトエタノール（ $5 \times 10^{-5}$  M）、ジェンタマイシン（10μg/ml）および牛胎児血清（FCS）（CSL社製、10%）を加えた培地（以下正常培地という）に、さらに8-アザグアニン（15μg/ml）を加えた培地で継代するが、細胞融合の3～4日前に正常培地に継代し、融合時に2×

4

10<sup>7</sup>個以上の細胞数を確保する。

#### 【0015】（3）細胞融合

（1）で免疫した各々の抗体産生細胞と（2）で得られた骨髄腫細胞をMEM培地またはPBS（リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2）でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髄腫細胞＝5～10：1になるよう混合し、遠心分離（1,200rpm、5分）した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングリコール-1,000（PEG-1,000）2g、MEM培地2mlおよびジメチルスルホキシド0.7mlの混液0.2～1ml/10<sup>8</sup>抗体産生細胞を加え、1～2分間毎にMEM培地1～2mlを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mlになるようにする。遠心分離（900rpm、5分）後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに細胞をHAT培地〔正常培地にヒポキサンチン（10<sup>-4</sup> M）、チミジン（1.5×10<sup>-5</sup> M）およびアミノプテリン（4×10<sup>-7</sup> M）を加えた培地）100ml中に懸濁する。

【0016】この懸濁液を96穴培養用プレートに100μl/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとり酵素免疫測定法などにより、c-erbB-2遺伝子産物を発現している細胞と反応し、c-erbB-2遺伝子産物を発現していない細胞と反応しないハイブリドーマを選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す〔1回目はHT培地（HAT培地からアミノプテリンを除いた培地）、2回目は正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。また、同様の方法を用いて、抗CD3モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製する。

#### 【0017】（4）モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理〔2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン（Pristane）0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する〕した8～10週令のマウスまたはヌードマウスに、（3）で得られた抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞、および抗CD3モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞2×10<sup>6</sup>～5×10<sup>7</sup>細胞/匹を腹腔内注射する。10～21日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離（3,000rpm、5分）して固形分を除去後、40～50%硫酸アンモニウムで塩析し、DEAEセファロースカラム、プロテインA-カラムあるいはセルロファインGSL2000（生化学工業社製）のカラムに通塔し、IgG画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

【0018】抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキット（ザイメット社製）ある

5

いはラットモノクローナル抗体タイピングキット（ノルディックイムノロジー社製）を用いて行う。蛋白量の定量は、ローリー法および280nmでの吸光度より算出して行う。

【0019】（5）バイスベシフィック抗体の作製  
ババインやベプシンを用いて作製した抗CD3モノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメント〔ジャーナル・オブ・イムノロジー(J. Immunol.), 131, 2895 (1983)〕をDTTなどの還元剤を用いて還元する。還元反応をDTNBで停止させ、生成されるFab'-S-NBをゲルクロマトグラフィーで単離する。また、ババインやベプシンを用いて作製した抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントもやはりDTTなどの還元剤を用いて還元し、得られるFab'-SHをゲルクロマトグラフィーで精製する。

【0020】Fab'-S-NBとFab'-SHを1:1で混合し、数時間インキュベーションし、生成される再構成F(ab')<sub>2</sub>をゲルクロマトグラフィーで単離し、バイスベシフィック抗体として以下の実験に供する。

【0021】

（6）バイスベシフィック抗体の反応性の確認

（5）で作製されたバイスベシフィック抗体とヒトリンパ球およびc-erbB-2遺伝子産物陽性細胞との反応性を蛍光抗体法（抗体実験マニュアル、E. Harlow, D. Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory刊、1988年）などにより調べる。

【0022】

（7）バイスベシフィック抗体の抗腫瘍効果-1-

ヒト末梢血リンパ球からセルソーターを用いてCD4陽性T細胞を分離し、抗CD3抗体とインターロイキン-2(IL-2)の存在下で培養することによりリンパ球を活性化（以下活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞という）する。活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞と<sup>51</sup>Crで標識したc-erbB-2遺伝子産物陽性細胞をバイスベシフィック抗体の存在下および非存在下で培養し、死滅細胞から遊離する<sup>51</sup>Crのガンマー線を測定することにより抗腫瘍効果を調べる。

【0023】

（8）バイスベシフィック抗体の抗腫瘍効果-2-

活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞とc-erbB-2遺伝子産物陽性癌細胞をバイスベシフィック抗体とともにマウスに移植し、癌細胞により形成される腫瘍の大きさを測定することにより抗腫瘍効果を調べる。以下に本発明の実施例を示す。

【0024】

【実施例】

実施例1

（1）動物の免疫と抗体産生細胞の調製

6週令BALB/cマウスに、c-erbB-2遺伝子産物を高発現しているヒト乳癌細胞SK-BR-3(ATCC番号HTB30)約1×10<sup>6</sup>細胞/回を静脈内投与および腹腔内投与により1週間

6

に1回、計6回投与した。眼底静脈叢より採血し、その血清抗体価を蛍光抗体法（抗体実験マニュアル、E. Harlow, D. Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory刊、1988年）で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。脾臓をMEM培地（日本製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離（1,200rpm、5分）した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム液（pH7.65）で1~2分間処理し赤血球を除去し、MEM培地で3回洗浄し細胞融合に用いた。

【0025】（2）マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株P3-X63-Ag8653を正常培地で培養し、細胞融合時に2×10<sup>6</sup>以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

【0026】（3）ハイブリドーマの作製

上記（1）で得られたマウス脾細胞と上記（2）で得られた骨髓腫細胞とを10:1になるよう混合し、遠心分離（1,200rpm、5分）した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングリコール-1,000（PEG-1,000）2g、MEM培地2mlおよびジメチルスルホキシド0.7mlの混液0.2~1ml/10<sup>6</sup>マウス脾細胞を加え、1~2分間毎にMEM培地1~2mlを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mlになるようにした。遠心分離（900rpm、5分）後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかに細胞をHAT培地100ml中に懸濁した。

【0027】この懸濁液を96穴培養用プレートに100μl/穴ずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で10~14日間培養した。培養上清がSK-BR-3細胞と反応し、c-erbB-2遺伝子産物を発現していないNIH-3T3（ATCC番号CRL1658）細胞とは反応しないウェルを選び、さらにHT培地と正常培地に換え、2回クローニングを繰り返して、抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマを選択した。

【0028】このハイブリドーマSER-4の産生するモノクローナル抗体SER-4は、c-erbB-2遺伝子産物を発現しているヒト胃癌細胞KATOIII（ATCC番号HTB103）、ヒト大腸癌細胞LS174T（ATCC番号CL188）、およびマウス細胞NIH-3T3にc-erbB-2遺伝子を導入し、c-erbB-2遺伝子産物を高発現するようになった細胞A4-15と強く反応し、c-erbB-2遺伝子産物を発現していないマウス細胞NIH-3T3、マウス細胞NIH-3T3にBcras遺伝子を導入した細胞RASCD、およびヒトB細胞リンホーマ細胞Daudi（ATCC番号CCL213）とは全く反応しなかった。抗CD3モノクローナル抗体については、該抗体を生産するハイブリドーマOKT-3（ATCC番号CRL8001）をATCCより購入した。

【0029】（4）モノクローナル抗体の製造

プリスタン処理した8週令ヌード雌マウスに上記（3）で得られたハイブリドーマ株5~10×10<sup>6</sup>細胞/匹をそれぞれ別のマウスに腹腔内注射した。10~21日

7

後にハイブリドーマは腹水癌化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取(1~8ml/匹)し、遠心分離(3,000rpm、5分)して固形分を除去した。

【0030】モノクローナル抗体がIgGのときは、得られた腹水を結合バッファー(1.5Mグリシン-3M NaCl, pH9)で透析後プロテインA-セファロースカラム(ファルマシア社製)に通塔し、カラムを洗浄後溶出バッファー(0.1Mクエン酸 pH4.0)でIgG画分を溶出した。溶出後塩化ナトリウム0.5Mを添加したPBSですみやかに透析し、精製モノクローナル抗体とした。

【0031】抗体のサブクラスをマウスモノクローナル抗体タイピングキットで決定したところ、c-erbB-2遺伝子産物に対するモノクローナル抗体SER-4はIgG1、CD3に対するモノクローナル抗体OKT-3は、IgG2aであった。

【0032】(5) バイスベシフィック抗体の作製  
モノクローナル抗体OKT-3をペプシン(シグマ(Sigma)社製)で0.1Mクエン酸バッファー(pH4.1)中、37℃で2時間処理し、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを調製した。この酵素反応は、1M NaHCO<sub>3</sub>を加えてpHを8に上げることで停止させた。また、モノクローナル抗体SER-4は、システイン存在下、活性化パバイン[ワーシントン(Worthington)社製]で3mM EDTAを含む0.1M酢酸バッファー(pH5.5)中、37℃で3時間処理してF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを調製した。この酵素反応は最終濃度10mMになるようにヨードアセトアミドを加えて停止させた。このようにして得られた2種のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントをそれぞれゲルクロマトグラフィーで精製した。

【0033】モノクローナル抗体OKT-3のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを0.5mM DTTで30分、pH7.5で処理し還元した。還元反応は、DTNB(最終濃度5mM)で停止させ、生成したF(ab')<sub>2</sub>-S-NBをゲルクロマトグラフィーで単離した。モノクローナル抗体SER-4のF(ab')<sub>2</sub>フラグメントもやはり0.5mM DTTを用いて還元し、Fab'-SHをゲルクロマトグラフィーで精製した。Fab'-S-NBとFab'-SHを1:1で混合し、4時間室温でインキュベーションし、生成される再構成F(ab')<sub>2</sub>をゲルクロマトグラフィーで単離し、バイスベシフィック抗体として以下の実験に供した。第1図にバイスベシフィック抗体の作製法の概略を示す。

【0034】

(6) バイスベシフィック抗体の反応性の確認

活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞およびNIH-3T3細胞にc-erbB-2遺伝子を導入し、c-erbB-2遺伝子産物を高発現するようになった細胞A4-15に対する上記(5)で作製されたバイスベシフィック抗体の反応性を蛍光抗体法により調べた。反応性はフローサイトメトリー(FACScan)で解析した。結果を第2図に示す。

【0035】活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞に対しては、モノクローナル抗体OKT-3とバイスベシフィック抗体が反応し、モノクローナル抗体SER-4は反応しなかつ

8

た。一方、細胞A4-15に対しては、バイスベシフィック抗体とモノクローナル抗体SER-4は反応したが、モノクローナル抗体OKT-3は反応しなかった。このように、作製されたバイスベシフィック抗体はCD3陽性リンパ球とc-erbB-2遺伝子産物産生細胞の両方に反応する活性があることが確かめられた。

【0036】

(7) バイスベシフィック抗体の抗腫瘍効果-1-

活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞と<sup>51</sup>Crで標識したc-erbB-2遺伝子産物陽性細胞を20:1の比率でバイスベシフィック抗体(1μg/ml)の存在下および非存在下で4時間培養し、死滅細胞から遊離する<sup>51</sup>Crのガンマー線を測定することにより抗腫瘍効果を調べた。その結果、第3図に示すようにc-erbB-2遺伝子産物を高発現しているSV11、A4-15、KATOIII、LS174Tの各細胞は高率に死滅した。一方、c-erbB-2遺伝子産物を発現していないNIH-3T3、RAScD、Daudiの各細胞はほとんど死滅しなかった。

【0037】

(8) バイスベシフィック抗体の抗腫瘍効果-2-

活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞2×10<sup>7</sup>個と各種癌細胞2×10<sup>6</sup>個をバイスベシフィック抗体(10μg)とともに混合し、BALB/cヌードマウスに皮下移植した。その結果、第4図に示すように、c-erbB-2遺伝子産物を高発現している細胞A4-15(図4-A)とLS174T(図4-C)では、活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞とバイスベシフィック抗体を組み合わせたときのみ腫瘍形成を抑制し、無処理、活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞単独処理、バイスベシフィック抗体単独処理では、腫瘍形成の抑制は認められなかった。また、c-erbB-2遺伝子産物を発現していない細胞RAScD(図4-B)では、無処理、活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞とバイスベシフィック抗体の組み合わせ処理とも腫瘍形成の抑制は認められなかった。

【0038】

【発明の効果】本発明によれば癌の治療に有効な抗c-erbB-2遺伝子産物モノクローナル抗体と抗CD3モノクローナル抗体からなるバイスベシフィック抗体を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 第1図は、バイスベシフィック抗体の作製法の概略を示す。

【図2】 第2図は、バイスベシフィック抗体と活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞(図A)および細胞A4-15(図B)との反応を蛍光抗体法で調べ、フローサイトメトリー(FACScan)で解析した結果を示す。a; 抗体を反応させないときの蛍光パターン。b; モノクローナル抗体OKT-3を反応させたときのパターン。c; モノクローナル抗体SER-4を反応させたときのパターン。d; バイスベシフィック抗体を反応させたときのパターン。

【図3】 第3図は、バイスベシフィック抗体の抗腫瘍

9

10

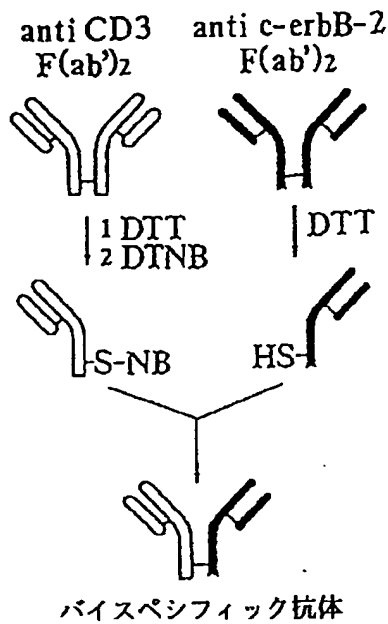
効果-1-を示す。第3図の白ヌキグラフは、バイスベシフィック抗体非存在下、斜線グラフは、バイスベシフィック抗体存在下における細胞障害活性を示す。

【図4】 第4図は、バイスベシフィック抗体の抗腫瘍効果-2-を示す。第4-A図はA4-15細胞、第4-B図はR

AScD細胞、第4-C図はLS174T細胞における抗腫瘍効果を示す。は活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞とバイスベシフィック抗体の組み合わせ処理、△は活性化CD4<sup>+</sup>ヘルパー/キラー細胞単独処理、◆はバイスベシフィック抗体単独処理、○は無処理を表す。

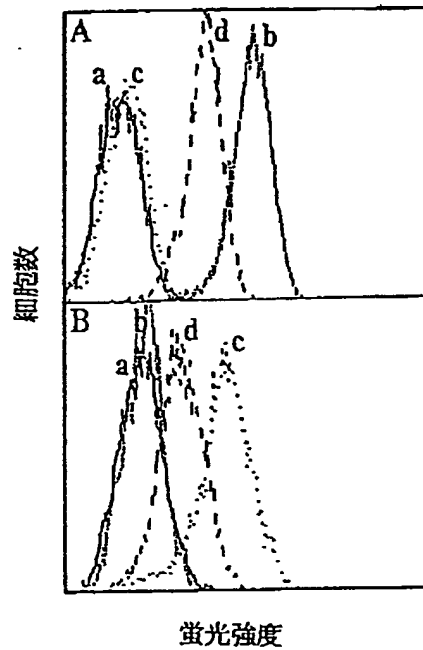
【図1】

第1図



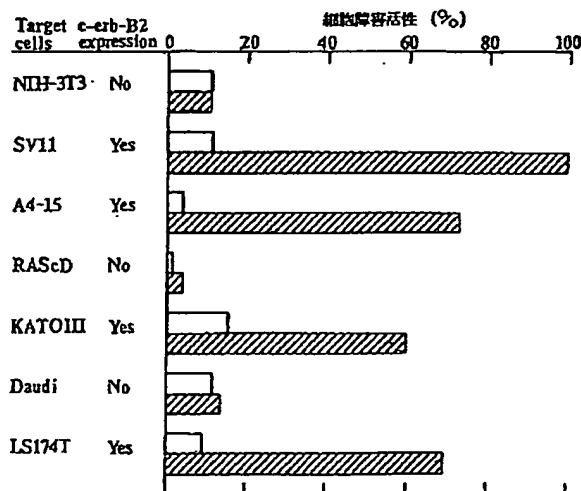
【図2】

第2図



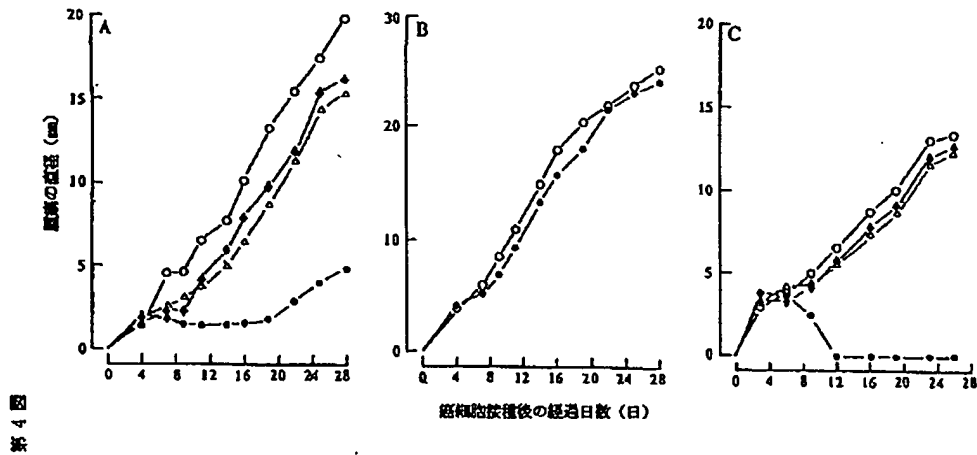
【図3】

第3図





【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

弁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 15/06

C 1 2 P 21/06

21/08

8214-4B

8214-4B

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)